

4.2 分析の信頼性に関する記録

以下のデータを記録し、整理・保管しておき、測定データの信頼性管理に関する報告の要請があった場合に提出する。

- (1) 試料の採取方法、保管方法
- (2) 試料の状況
- (3) 試料の前処理法
- (4) 標準物質等のメーカー、製品番号及びロット番号
- (5) 分析装置の操作条件及び校正結果
- (6) 検量線のRRF、感度、操作ブランク値、回収率、検出下限

5. 内部精度管理

適切な標準試料(注56)を用い、年1回以上、測定値が認証値の範囲内であることを確認する。

6. 外部精度管理

食品中のダイオキシン類検査を行う公的検査機関及び登録検査機関にあっては、ダイオキシン類を対象とした外部精度管理調査へ年1回以上参加し、分析値の信頼性を評価することが望ましい。

第4節 安全管理

1. 施設

標準品の取扱い及び分析操作は、全て管理区域内で行い、当該区域内は陰圧にするなど、外部へのダイオキシン類の放出防止設備が設けられていること。

(1) 実験室

① 実験室は、専用の実験室とする。

② 実験室は、可能であれば2～3のエリアに仕切った方がよい。その場合の各エリアの役割は、下記のとおりである。

ア) 試料の分解、抽出、精製及び濃縮を行うエリア

イ) ガスクロマトグラフ質量分析装置(GC-MS)による分析を行うエリア

③ 共用のGC-MSを用いるときは、一定期間をダイオキシン類分析専用とするとともに、本体及び周辺の汚染のないように実験を行う。

④ 測定区域内の汚染(分析の際のバックグラウンド値の上昇)を防止するため、実験室内に排ガス、フライアッシュ等、高濃度汚染試料を持ち込まないこと。

2. 実験室等の立入規制

(1) 実験室への立入りは、関係者に限定する。

(2) 実験室のドアには、関係者以外立入らないよう表示を行う。

3. 換気システム

(1) 実験室は、ドラフトチャンバーにより排気を行う。

(2) 排気された空気は、外部環境汚染防止のため、活性炭フィルター等の処理装置により処理したのち、排出する。

(3) 給気は、フィルター等により、粒子状物質に吸着したダイオキシン類が進入しないよう管理すること。

(4) 室内汚染防止のため、質量分析計のポンプやガスクロマトグラフの排気部分に、フィルター等を設置すること。

4. その他の設備

(1) グローブボックス

多量のダイオキシン類を取扱う場合は、グローブボックス内で行う。

(2) 紫外線ランプ

ダイオキシン類の汚染部位を照射するために使用する。

(3) 排気

GC-MSに付属するすべてのポンプ排気は、ドラフトチャンバーのダクトのように、活性炭フィルター等の処理装置を通じて排気する。

5. 実験室内での業務

- (1)実験室内では、専用の実験衣及び靴を着用する。
- (2)作業中は、手袋、安全眼鏡等を着用する。
- (3)ホールピペット、メスピペット等を使用する際は、安全ピペッター等を使用し、口で吸い上げてはならない。

6. 標準物質の取扱い

- (1)すべての標準溶液の目録を作成する。
- (2)すべての標準溶液は、二重栓式試料瓶等に入れ冷蔵庫に保管する。多量の標準物質及び標準溶液は、施錠できる保管庫に保管する。

7. 試料の取扱い

- (1)濃縮した抽出液は、密閉できるミニ試料瓶等に入れ、冷蔵庫に保管する。
- (2)長期間の保管が予想されるときは、褐色アンプル中に封入し、破損しないように保護したのち、冷蔵保管する。
- (3)ダイオキシン類を含む試料を運搬する場合は、万一容器が破損した場合でも、外部に漏れないよう、密閉形のプラスチックコンテナに入れて運ぶ。

8. 実験中の事故の処置

食品試料中のダイオキシン類の分析は、取扱量が微量であることから、特段高い危険があるとは考えられないが、実験中の事故等の場合は、実験室を使用する者に連絡するとともに、以下の処置を行う。

- (1)ダイオキシン類を含む抽出液等を実験中に浴びる等の皮膚接触が起きた時は、直ちに接触部位を石鹼で洗う。
- (2)実験室内で漏洩事故があった場合は、汚染した部位を、水で湿らせた紙タオルでふき、ついでその部位を、アルコール又はトルエン等の有機溶媒でふき取る。

9. 廃棄物の保管処分等

- (1)有害固形廃棄物（汚染されたと疑われる手袋、マスク、紙タオル、活性炭フィルター等）は、専用ポリバケツに入れて保管する。
- (2)有害液体廃棄物（分析プロセス及び器具の洗浄で生じた汚染廃溶媒並びにガスクロマトグラフ質量分析装置の廃オイル等）は、専用の密閉容器に入れて保管する。
- (3)廃水は、活性炭等により適切に処理した後、排水する。

10. 作業記録

- (1) 実験室立入者の記録をする。
- (2) 作業日報を作成し、分析従事者の作業時間等を記録する。
- (3) 標準溶液は、物質名、数量、濃度、入手先、供与先等を記録し、使用状況も記録する。
- (4) 廃棄物の保管状況や処理状況を記録する。
- (5) その他必要と考えられる事項を記録する。

11. 健康診断

本ガイドラインに示した分析では、有機溶媒等も使用するため、労働安全衛生法に定められた特定化学物質に係る定期的健康診断を実施すること。ダイオキシン類の影響については、血清中のトリグリセライド、コレステロール等が指標となる。

- (注1) 本ガイドラインの「水」は、食品衛生法の対象となる飲用に供する水を指す。水道水に関しては、「水道原水及び浄水中のダイオキシン類調査マニュアル」（厚生労働省健康局水道課）が作定されており、調査目的に応じそれを利用することも差し支えない。
- (注2) 解凍時に水分や油分が分離した場合は良くかき混ぜ、試料の均一性に配慮する。
- (注3) 試料採取量を増やすことが困難な場合は、最終検液量、注入量等を変更し、目標検出下限を達成しても良い。
- (注4) 農水産物の採取部位の例を次に示す。
- ア. 米（精米）、小麦、大豆、小豆
粉状になるまで粉碎し、425 μm のふるいを通過するよう処理し、均一化する。
 - イ. ほうれん草
赤色根部を含み、ひげ根及び変質葉は除き、根部に付着した泥、土等は流水で洗浄し、水切りし、均一化する。
 - ウ. 小松菜
根及び変質葉を除き、根部に付着した泥、土等は流水で洗浄し、水切りし、均一化する。
 - エ. さといも、ごぼう
泥を流水で洗浄した後、皮を除去し（ごぼうを除く。）、均一化する。
 - オ. レタス
外側の変質葉及びしんを除去し、均一化する。
 - カ. なす、ピーマン、トマト
へたを除去し、皮も含めて均一化する。
 - キ. わかめ、こんぶ
変質部分等食用に適さない部分を除いて、均一化する。
 - ク. 柿
へた、果皮及び種子を除去する。
 - ケ. バナナ
果柄部、果皮を除去する。
- (注5) 試料の採取部位に関する情報を、可能な限り詳細に記録する（頭部、骨、内臓、皮、ひれを除いた筋肉部を分析に供したなど）。
- (注6) ダイオキシン類分析用溶媒としては、次のものがある。
- アセトン（関東化学、和光純薬工業）
 - ジクロロメタン（関東化学、和光純薬工業）
 - ジエチルエーテル（和光純薬工業）
 - エタノール（関東化学、和光純薬工業）
 - ヘキサン（関東化学、和光純薬工業）
 - メタノール（関東化学、和光純薬工業）
 - トルエン（関東化学、和光純薬工業）
- (注7) 市販のシリカゲルとしては、ワコーゲルS-1（和光純薬工業）、ワコーゲルDX（和光純薬工業）又は洗浄済みシリカゲル（スペルコ）がある。
- (注8) 市販の水酸化カリウムシリカゲルとしては、ダイオキシン類分析用（和光純薬工業、ジ

ーエルサイエンス)がある。

(注9) 市販の硫酸シリカゲルとしては、ダイオキシン類分析用 (和光純薬工業、ジーエルサイエンス)がある。

(注10) 市販の硝酸銀シリカゲルとしては、ダイオキシン類分析用 (和光純薬工業、ジーエルサイエンス)がある。

(注11) 市販のアルミナとしては、Alumina B-Super I (MP Biomedicals) 又はAluminium oxide 90 (メルク社)がある。

(注12) 市販品として活性炭埋蔵シリカゲル (和光純薬工業) 又は活性炭分散シリカゲル (関東化学)がある。

(注13) 分析値は、採取試料と標準物質の分析結果を比較することによって得られるため、分析値の信頼性を確保するためには、可能な限りトレーサビリティの保証された標準物質を用いる必要がある。

(注14) ダイオキシン類の標準溶液や内標準溶液はCambridge Isotope Laboratories 社 (和光純薬工業、大塚製薬) 及びWellington Laboratories 社 (関東化学) より市販されている。

① PCDDs及びPCDFsに関しては、例えば、混合標準溶液として、Cambridge Isotope Laboratories 社 (和光純薬工業、大塚製薬)からEDF-4961、Wellington Laboratories 社 (関東化学)から、DF-CVS-A10 が販売されている。

内標準溶液として、表-補-1の例1のクリーンアップスパイクとしてCambridge Isotope Laboratories 社 (和光純薬工業、大塚製薬)からEDF-4974-A、シリンジスパイクとしてEDF-4965-Aが販売されている。

また、表-補-1の例2のクリーンアップスパイクとしてWellington Laboratories 社 (関東化学)からDF-LCS-A、シリンジスパイクとしてDF-IS-Iが発売されている。

② コプラナーPCBsに関しては、例えば混合標準液として、Cambridge Isotope Laboratories 社 (和光純薬工業、大塚製薬)からEC-4962、Wellington Laboratories 社 (関東化学)から、PCB-CVS-A10が発売されている。

内標準溶液として、Cambridge Isotope Laboratories 社 (和光純薬工業、大塚製薬)から、クリーンアップスパイクとしてEC-4969-A、シリンジスパイクとしてEC-4970-Aが発売されている。

また、表-補-1のクリーンアップスパイクとしてWellington Laboratories 社 (関東化学)からPCB-LCS-A、シリンジスパイクとしてPCB-IS-Aが発売されている。なお、PCBは化審法の第1種特定化学物質に指定されており、購入にあたって経済産業大臣の許可が必要になるため、入手には1~2ヵ月を要する。

(注15) トルエン、デカン又はイソオクタンを用いてもよい。

(注16) ① 試料 (場合によっては抽出液) に添加して前処理の結果を確認し、ダイオキシン類を定量するための基準として用いる内標準物質をクリーンアップスパイクという。GC-MS試料溶液に添加して、注入量の確認と、クリーンアップスパイクの回収率を求めるために用いる内標準物質をシリンジスパイクという。クリーンアップスパイクとシリンジスパイクは、それぞれ別の異性体を用いる。定量用の内標準物質として、すべての化合物に対して、その安定同位体標識化合物を用いることが望ましいが、少なくとも各塩素数ごとに、最低1種類ずつ添加する。しかし、これらの内標準物質は、質量分

表-補-1 内標準物質の使用例

内標準物質	例1		例2	
	クリーンアップスパイク	シリンジスパイク	クリーンアップスパイク	シリンジスパイク
¹³ C ₁₂ -1,2,7,8-TCDF				○
¹³ C ₁₂ -1,3,6,8-TCDF			○	
¹³ C ₁₂ -2,3,7,8-TCDF	○		○	
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4-TCDD		○		
¹³ C ₁₂ -1,3,6,8-TCDD			○	
¹³ C ₁₂ -2,3,7,8-TCDD	○		○	
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,6-PeCDF				○
¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8-PeCDF	○		○	
¹³ C ₁₂ -2,3,4,7,8-PeCDF	○		○	
¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8-PeCDD	○		○	
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,6,9-HxCDF				○
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8-HxCDF	○		○	
¹³ C ₁₂ -1,2,3,6,7,8-HxCDF	○		○	
¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8,9-HxCDF	○		○	
¹³ C ₁₂ -2,3,4,6,7,8-HxCDF	○		○	
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8-HxCDD	○		○	
¹³ C ₁₂ -1,2,3,6,7,8-HxCDD	○		○	
¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8,9-HxCDD		○	○	
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,6,8,9-HpCDF				○
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	○		○	
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	○		○	
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	○		○	
¹³ C ₁₂ -OCDF	○		○	
¹³ C ₁₂ -OCDD	○		○	

内標準物質	クリーンアップ* スパイク	シリンジ* スパイク
¹³ C ₁₂ -2,3',4',5-TCB		○
¹³ C ₁₂ -3,3',4,4'-TCB	○	
¹³ C ₁₂ -3,4,4',5-TCB	○	
¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4'-PeCB	○	
¹³ C ₁₂ -2,3,4,4',5-PeCB	○	
¹³ C ₁₂ -2,3',4,4',5-PeCB	○	
¹³ C ₁₂ -2',3,4,4',5-PeCB	○	
¹³ C ₁₂ -3,3',4,4',5-PeCB	○	
¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5-HxCB	○	
¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5'-HxCB	○	
¹³ C ₁₂ -2,3',4,4',5,5'-HxCB	○	
¹³ C ₁₂ -3,3',4,4',5,5'-HxCB	○	
¹³ C ₁₂ -2,2',3,3',4,4',5-HpCB	○	
¹³ C ₁₂ -2,2',3,4,4',5,5'-HpCB	○	
¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	○	

析計の設定分解能によっては、分析に妨害を与える場合があるので、その使用に際しては、妨害しない条件を十分に検討・確認しておく。内標準物質の使用例を、表-補-1に示す。

- ②クリーンアップスパイク及びシリンジスパイクに加え、カラム精製の結果を確認するために、別途内標準物質を添加する方法がある（EPAメソッド1613）。この場合も、添加する内標準物質が分析に妨害しないことをあらかじめ確認する必要がある。

(注17) カラムブリードが低いカラムを使用する。

- ① PCDDs及びPCDFsの分析では、2,3,7,8-位塩素置換異性体を含む全ての異性体について、それぞれ分離が良好で、それらの異性体のクロマトグラム上における溶出順位の判明しているカラムの使用を標準とする。さらに、2,3,7,8-TCDDのピーク高さ (a) とその他のTCDD異性体との谷の高さ (b) の比 (b/a) が25%を超えないカラムを使用する（図-補-1参照）。様々な要因を考慮し、2種以上の極性の異なるキャピラリーカラムの併用が望ましい。SP-2331（スペルコ社製）、DB-17（J&W Scientific社製）、DB-5ms（J&W Scientific社製）、BPX-DXN（SGE Analytical Science社製）、CP-Sil 88（バリアン社製）等がある。

$$b / a \times 100 = 25$$

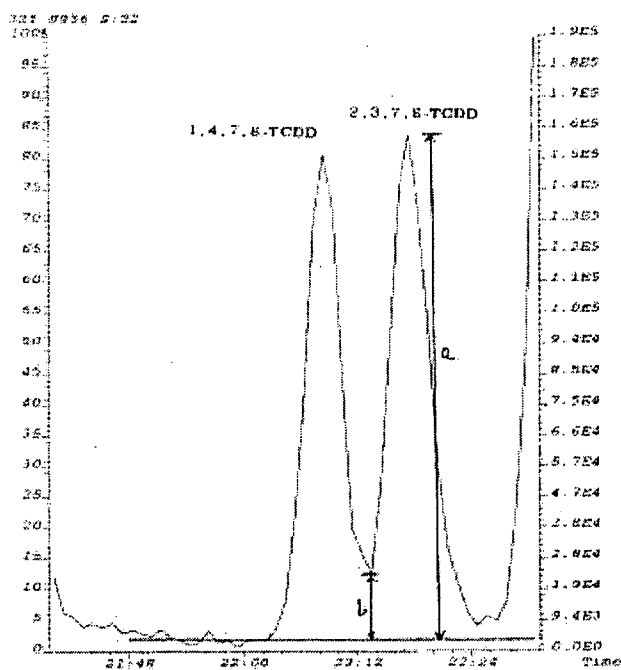


図-補-1 2,3,7,8-TCDDのピークの分離

- ②コプラナーPCBsの分析では、12種類全ての異性体について、それぞれ分離が良好で、それらの各異性体のクロマトグラム上における溶出順位の判明しているカラムの使用を標準とする。DB-5ms（J&W Scientific社製）、HT-8（SGE Analytical Science社製）、HT8-PCB

(関東化学) 等がある。

(注18) 操作ブランク試験は、試験液の調製又は分析機器への導入操作等に起因する汚染を確認し、試料の分析に支障のない分析環境を設定し、分析値の信頼性を確保するために行うものであり、試料の分析と同時に行う。

操作ブランクの確認は、操作ブランク値を食品中の濃度に換算した値が、目標検出下限を超える場合には、器具の再洗浄や機器の調整を行ない、操作ブランク値の低減に努める。

操作ブランク値が大きいと、分析感度が悪くなるばかりでなく、検出下限が大きくなって、分析値の信頼性が低下する。したがって、操作ブランク値は、極力低減を図らなければならない。また、実験室空気からのダイオキシン類の汚染を防止するために、必要に応じてクリーンドラフトの中で実験操作を行う。

(注19) 同等以上の性能を有するのであれば、固相抽出法なども使用できる。

(注20) アルカリ分解後に未分解物が認められる場合は、抽出効率を考慮するため必要に応じて未分解物を分離し別途抽出を行う。

(注21) 分解時間は、攪拌しない場合は12時間程度放置する。水酸化カリウム/エタノール溶液によるアルカリ分解では、一部のダイオキシン類が脱塩素化することが知られており、アルカリ分解の時間や温度などの条件に注意する。

(注22) 水分を含んだ試料の場合、約4~10倍量の無水硫酸ナトリウムを加え、よく攪拌しながら、脱水、粉末状にする。

(注23) ガラス又は石英繊維製のものを使用し、使用に先立ってアセトン及びトルエン等で予備洗浄を行う。

(注24) 脂肪含量を測定するための脂肪抽出法は、ここに示されている以外の方法を用いてもよい。その場合は、適用した方法を記録する。

(注25) 1) カラムクロマトグラフィーにおいて使用する充てん剤や溶媒の種類及び量は、標準溶液等を用いて分画試験を行って決めなければならない。操作ブランク試験用の試料溶液も同様に操作を行う。

2) 前処理終了後、試料溶液に着色がなく、不揮発性成分が目視で確認できない状態まで、十分にクリーンアップを行う。着色していたり、残留物が認められる場合は、キャピラリーカラムにおける成分の分離能の低下、装置のイオン源の汚染に伴う感度変動等による精度の低下、さらにPFK等の校正物質によるロックマス方式による質量校正の妨害等の原因となる。

3) ここに示した手順は標準的なものであり、精製の効果を十分得るための試薬量は、試料に応じ適宜増減させてよい。

(注26) 硫黄分除去が必要な場合は、硝酸銀処理又は銅チップ処理を行う。具体的には硝酸銀シリカゲル又は銅チップ（塩酸処理した銅線を細かく切ったもの）をカラムにつめて、試料溶液を通過させる。

(注27) 濃硫酸の添加操作は、硫酸と有機物の反応による発熱のため、溶媒の突沸が起こることがあるので十分注意し、数mL程度の添加から始め、着色の度合いにより徐々に加える。また、必ず手袋やマスク等の保護具を使用すること。

- (注28) 試料によっては、本クリーンアップ操作は省くことができる。硫黄分の除去が不要な試料の場合に、本クリーンアップ操作が行われる。省略する時は確認すること。
- (注29) アルミナの極性は製造ロットや開封後の保存期間によってかなり変化が認められる。活性の低下したものでは、1,3,6,8-TCDD及び1,3,6,8-TCDF等が第1画分に溶出する。また2,3,3',4,4'-PeCB(#105)が規定量の溶媒では第1分画に十分に溶出しきれない場合や、OCDDやOCDFが規定量の溶媒では第2画分に十分に溶出しきれない場合があり、これについても分画試験で確認する。
- (注30) モノオルトPCBs画分と、PCDDs、PCDFs及びノンオルトPCBs分画が十分でない場合、抽出液又は硫酸処理の段階で分割し、モノオルトPCBsのみの分析用試料とし操作する。
- (注31) 市販の充填済み活性炭シリカゲルカラムとしては、活性炭分散シリカゲルリバースカラム（関東化学）がある。
- (注32) 硫酸処理を省略する場合は、最終抽出液は次のクリーンアップ法に適した処理（脱水処理）を行い、適した溶媒に置換する。
- (注33) 市販の充てん済み多層シリカゲルカラム（和光純薬工業、ジーエルサイエンス又はスペルコ）を用いてよい。
- (注34) 脂肪含量が高い食品などでは、アルカリ分解等により得られた試料抽出液を数回、硫酸処理した後、多層シリカゲルカラム処理することが望ましい。
- (注35) 1) 充てん部の着色がひどい場合は、新たに多層シリカゲルカラムクロマトグラフ管を作製し、同様の操作を繰り返す。
2) 通常の試料では、多層シリカゲルカラムの各充てん剤の分量（シリカゲル0.6g、2%水酸化カリウムシリカゲル1g、シリカゲル0.6g、44%硫酸シリカゲル1.5g、22%硫酸シリカゲル2g、シリカゲル0.6g、10%硝酸銀シリカゲル1g及び無水硫酸ナトリウム3g）を減じても良好なクリーンアップが行える。
- (注36) このほか、多層シリカゲルカラム→活性炭シリカゲルカラム→アルミナカラムの組合せで行う場合もある。
- (注37) 活性炭カラムHPLCを用いた組合せとして、下記の例がある。
① 硫酸処理→シリカゲルカラム→活性炭カラムHPLC
② 硫酸処理→銅チップ処理（硫黄分除去が必要な場合）→シリカゲルカラム→活性炭カラムHPLC
③ 硫酸処理→硝酸銀シリカゲルカラム→活性炭カラムHPLC
④ 多層シリカゲルカラム→活性炭カラムHPLC
（活性炭カラムHPLCで得られたPCDDs及びPCDFs画分とノンオルトPCBs画分については、必要に応じて更にアルミナカラムによるクリーンアップを行う。）
- (注38) 脂肪族炭化水素などの低極性物質の除去に有効であり、適宜行う。
- (注39) HPLC用活性炭カラムとしては、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製Hypercarb（porous graphitic carbon）がある。
- (注40) 約0.1mLまで濃縮し、オートサンプラー用バイアルに移し、更に濃縮しても良い。バイアルの容量が小さいので、濃縮用試験管の洗液は操作途中で順次あわせる。
- (注41) 窒素気流下による濃縮作業では、溶液の表面が動いているのがようやく見える程度に窒

素気流を調節し、溶液が飛散しないようにするとともに、乾固させないように注意する。溶液に渦ができるほど窒素を吹きつけたり、乾固させると、目的物質の損失をまねくことがある。

(注42) ダイオキシン類の脱塩素によって定量に影響を与える可能性がある。OCDDがHpCDDsの濃度に比較して高濃度である場合、HpCDDsの定量に影響することが考えられるので注意する。

(注43) キャピラリーカラムによって得られるピークの幅は、5~10秒程度であるが、ピークを構成するデータポイントを確保するためには、SIM法における周期は、最大でも1秒以下にしなければならない。また、一つのピークに対して十分なデータポイントを確保するため、クロマトグラムにおける単独成分ピークの最も幅の狭いピークであってもそのピークを構成するデータポイントが7点以上となるように選択イオン検出のサンプリング周期を設定することが望ましい。1回の分析で設定可能なモニターチャンネルの数は、要求される感度との兼ね合いとなるので、十分に検討した上で設定する必要がある。クロマトグラム上の各ピークの保持時間を考慮して、時間分割によるグルーピング方式によって分析しても良いが、この場合には各グループごとに、適切な内標準物質ピークが出現するように、条件の設定を行う必要がある。

(注44) モニターイオンの質量範囲によっては、イオン加速電圧の変化が大きくなり、装置分解能が変化する場合がありますため、測定質量範囲内の分解能のチェックを行う。

(注45) ノイズ幅 (N) 及びピーク高さ (S) は一般に次のようにして求める。まず、ピークの近傍 (ピークの半値幅の 10 倍程度の範囲) のノイズを計測しその標準偏差の 2 倍をノイズ幅 (N) とするか、経験的にノイズの最大値 (E_1) と最小値 (E_2) との幅は、およそ標準偏差の 5 倍となるため、その幅の 2/5 をノイズ幅 (N) とする。一方、ノイズの中央値 (C) をベースラインとし、ベースラインのノイズを元にピークトップ (D) を決めて、この幅をピーク高さ (S) とする (図-補-2 参照)。

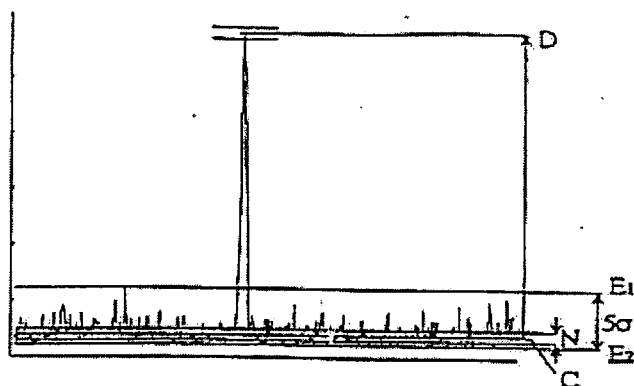


図-補-2

(注46) この濃度範囲は検出下限の値に近い低濃度を含み、GC-MSのダイナミックレンジ内であればならない。

(注47) SIM クロマトグラム上の二つ以上のモニターイオンのピーク面積比が、標準物質のもの

とほぼ同じであり、同位体の天然存在比に対して±15%（検出下限付近の濃度によっては土 25%）以内であれば定量する（表-補-2 参照）。

特に 2,3,7,8-位塩素置換異性体は、得られた SIM クロマトグラム上のピークの良好な分離とともに、保持時間が標準物質とほぼ同じであり、対応する内標準物質との相対保持時間も標準物質と一致することで同定を行う。また標準物質のない異性体の同定については、文献などを参照して同定する。

表-補-2 塩素原子数による同位体ピークの天然存在比

	M	M+2	M+4	M+6	M+8	M+10	M+12	M+14
TCDDs	77.43	100.00	48.74	10.72	0.94	0.01		
PeCDDs	62.06	100.00	64.69	21.08	3.50	0.25		
HxCDDs	51.79	100.00	80.66	34.85	8.54	1.14	0.07	
HpCDDs	44.43	100.00	96.64	52.03	16.89	3.32	0.37	0.02
OCDD	34.54	88.80	100.00	64.48	26.07	6.78	1.11	0.11
TCDFs	77.55	100.00	48.61	10.64	0.92			
PeCDFs	62.14	100.00	64.57	20.98	3.46	0.24		
HxCDFs	51.84	100.00	80.54	34.72	8.48	1.12	0.07	
HpCDFs	44.47	100.00	96.52	51.88	16.80	3.29	0.37	0.02
OCDF	34.61	88.89	100.00	64.39	25.98	6.74	1.10	0.11

	M	M+2	M+4	M+6	M+8	M+10	M+12	M+14
TCBs	76.67	100.00	49.11	10.83	0.93			
PeCBs	61.42	100.00	65.29	21.43	3.56			
HxCBs	51.22	100.00	81.48	35.51	8.75	1.17		
HpCBs	43.93	100.00	97.67	53.09	17.38	3.43		

M は最低質量数の同位体

各塩素数ごとにそれぞれ最大強度を示すイオンを100%とした値

- (注48) 定量は、2つのイオンのピーク面積値の合計又は主要ピークの面積を使って行う。
- (注49) ロックマスチャンネルのクロマトグラムで、分析対象物質の出現時間においてシグナルに±20%以上の変動が認められた場合は、その成分については定量してはならない。主要要因として、試料の前処理が不十分であることが考えられるので、試料の前処理を再度十分に行い、ロックマスの変動を最小限に抑える必要がある。
- (注50) 2,3,7,8-位塩素置換異性体の定量は、対応する標準物質を用いて行う。その他の異性体の定量については、各塩素置換体ごとに存在する2,3,7,8-位塩素置換体と同じ感度を持つものとして計算する。
- (注51) クリーンアップスパイクの回収率が、40%以上120%以下の範囲から外れるときは、再分析する。
- (注52) 特定のピークが妨害を受けた時、原則としてそのデータは使用できないが、そのピークの分析値に対して操作ブランク値が30%以下であれば、そのデータを使用してもよい。
- (注53) “当量”ではなく“等量”と書かれる場合もある。
- (注54) 表2-8及び表2-9は、検出された異性体の種類を明らかにし、検出が認められた異性体の実測濃度を毒性当量に換算するために用いられる。通常、残留実態を把握する目的で実施する検査では、検出された異性体を毒性当量に換算し、それらを合計して、検出され

たダイオキシン類を毒性当量として算出する（不検出のものは加算しない）。リスク（摂取量）の評価を行う場合には、試料中に検出下限未満の異性体が含まれる可能性を考慮して、未検出異性体について検出下限に1/2等の係数を乗じ、それらも合計して毒性当量を見積る方式があるが、そのような目的で利用する場合には、どの算出法を使用したのかを明記しておく。

(注55) GC-MSの性能を維持するには、日常的なメンテナンスを欠かしてはならない。特に、GCとのインターフェイスやイオン化室内の汚れは、感度や分解能、定量精度の低下に大きく影響するので、適宜洗浄する必要がある。

(注56) 内部精度管理に使用できる標準物質として下記のもので市販されている。

CRM607（天然粉末ミルク） : EC, Community Bureau of Reference（関東化学）
PCDDs, PCDFsの認証値がある。

WMF-1（魚凍結乾燥品） : National Research Council Canada（関東化学）
PCDDs, PCDFs, コプラナーPCBsの認証値がある。

Ⅱ. 分担研究報告書

2. 食品中のダイオキシン類等の有害化学物質に対する迅速測定

法の開発

2-1. ダイオキシン類に対する高感度レポータージーンアッセイの開発

分担研究者 堤 智昭

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
分担研究報告書

ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究
(2)食品中のダイオキシン類等の有害化学物質に対する迅速測定法の開発
(2-1)ダイオキシン類に対する高感度レポータージーンアッセイの開発

分担研究者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ダイオキシン類に対する芳香族炭化水素レセプターレポータージーンアッセイの高感度化を目的として、新規ダイオキシン類応答性レポーターベクターのダイオキシン類応答性を解析した。高感度化を狙った新規レポーターベクターとして、ダイオキシン類応答性 DNA 領域(DRE)を4~20個まで連結したルシフェラーゼレポーターベクターの検討を行った。各ベクターを培養細胞株(Hepalclc7)に一過性のトランスフェクションを行い、2,3,7,8-TCDD(31.4 pM及び1nM)に対する応答性を検討した。TCDDにより誘導されるルシフェラーゼ活性は、連結したDREの数が多くなると増大し、DREを4つしか含まない従来の場合と比較し、最大5倍の活性増強が認められた。また、DREの挿入方向が逆になった場合は、ルシフェラーゼ活性の増強が生じない傾向があった。各TCDD濃度におけるルシフェラーゼ活性倍率(各TCDD濃度における活性/TCDDを含まないブランクの活性)を算出したところ、DREを正方向に20個連結したpGL7.5Fベクターが最も高い倍率を示した。そこで、pGL7.5Fを含むいくつかのベクターについて、TCDD用量反応曲線(3.14~314 pM)を作製した。その結果、ルシフェラーゼ活性はTCDD濃度に依存して誘導され、特にpGL7.5FベクターではDREを4つしか含まない場合と比較すると、いずれの濃度でも高い活性が認められた。しかし、ルシフェラーゼ活性倍率については、いずれの濃度においても大幅な違いは認められなかった。この原因としては、レポーターベクター上の連結したDRE数が増えるに従い、ブランクにおけるルシフェラーゼ活性が上昇したためだと考えられる。今後は、ブランクにおける活性を下げる何らかの工夫が必要になると考えられる。

A.研究目的

我が国では、魚を介したダイオキシン類の摂取量が多いため、市販魚におけるダイオキシン類に対するスクリーニング法が開発できれば、食品衛生上有意義である。魚などの食品を対象にしたダイオキシン類のスクリーニング法としては、培養細胞を用いたレポータージーンアッセイ^{1,2)}や、酵素免疫測定法³⁻⁵⁾が検討されている。しかし、食品ではダイオキシン類の汚染濃度が環境試料と比較し低いことから、スクリーニング法の高感度化が強く望まれてき

た。

レポータージーンアッセイではダイオキシン類の芳香族炭化水素レセプター(AhR)を介した毒性発現機構を利用し、ダイオキシン類を検出する。これらのアッセイでは、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子にしたダイオキシン類応答性ベクターをDNAに組み込んだ培養細胞を使用する。ダイオキシン類は細胞内のAhRに結合した後、ダイオキシン類応答性ベクターのダイオキシン類応答性領域(DRE:dioxin responsive element)に結合しプロモ-

ター領域を活性化することで、定量指標となるルシフェラーゼ遺伝子の発現を誘導する。しかし、汎用されているダイオキシン類応答性ベクターは4個のDREしか含んでおらず⁶⁾、微量のダイオキシン類が十分にルシフェラーゼ遺伝子を誘導できない可能性が考えられた。そこで近年になり、高感度化を狙った目的でより多くのDREを連結したダイオキシン類応答性ベクターの開発が行われた⁷⁾。しかし、DRE挿入方向と感度の関係、用量反応曲線等の検討が不十分であった。本研究では、これらの新規ベクターのダイオキシン類応答性について詳細に検討した。

B. 研究方法

1. 試薬

MEM 培地及び牛胎児血清(FBS)はインビトロジェン社より購入した。また、トランスフェクション試薬であるトランスフェクトールはGenechoice社より、細胞溶解液(CCLR)及びルシフェラーゼ定量システム(スタンダードタイプ)はプロメガ社より購入した。BCAプロテインアッセイキットはピアス社製を使用した。2,3,7,8-TCDDは関東化学より購入した。ジメチルスルホキシド(DMSO)はシグマアルドリッチ社製を使用した。

DREを連結したダイオキシン類レポーターベクターは、マイケル S. デニソン教授(カリフォルニア大学)より供与して頂いた。図1には本レポーターベクターの作製法、表1には使用したレポーターベクターの概要を示した。本ベクターはDREを4つ含む514 bpの塩基配列部分を、1から5個まで連結し導入したものである。各ベクターは、バイオラッド社より購入したプラスミド精製キットにより精製した。

2. 装置

吸光度測定装置は、テカン社製のインフィニットF200を使用した。ルミノメーターはベルト

ールド社製のCentro LB960を使用した。

3. 一過性トランスフェクション

マウス肝ガン細胞株(Hepalclc7)を10%のFBSを含むMEM培地を用いて、CO₂インキュベーター内で培養した。6ウェルプレート(あるいは12ウェルプレート)に播種し、70~85%コンフルエントまで培養した。培養細胞はDNA溶液を加える約2時間前に2%のFBSを含むMEM培地に交換した。各DNA(800~2000 ng/well)を0.1M塩化ナトリウム水溶液で希釈し、トランスフェクトールと混合後、約20分間室温でインキュベートし培養細胞に加えた。24時間培養後、2,3,7,8-TCDD溶液を含む培地(DMSOの最終濃度は0.1%)に交換し、さらに24時間培養した。培養細胞はリン酸緩衝液で2回洗浄し、CCLRを加え、約15分間振とうした。その後、細胞をセルスクレーパーを使用して回収し、マイクロチューブに回収した。遠心操作後(10,000 rpm、2 min)、上清(20 µl)を96ウェルプレートに移した。ルシフェラーゼ発光量はルシフェラーゼ定量システムにより測定した。

4. タンパク質の定量

BCAプロテインアッセイキットにより定量した。ルシフェラーゼ活性を測定するために調整した細胞溶解液を遠心(10,000 rpm、2 min)し、上清を精製水で10倍希釈し測定試料とした。測定方法はキットの添付書に従った。

C. 研究結果及び考察

1. DRE数とダイオキシン類応答性の関係

DRE数とダイオキシン類応答性の関係を明らかにするため、連結DREを挿入したレポーターベクターを培養細胞に一過性発現し、2,3,7,8-TCDDに対する応答性を検討した。DREを4から20まで連結したレポーターベクターについては、DREの挿入向き(正方向と逆

方向)と TCDD 応答性についても検討した。また、ネガティブコントロールとして DRE を含まない pGL7.0 ベクター、ポジティブコントロールとしてレポータージーンアッセイで汎用されている pGL6.1 ベクター (DRE を 4 個含む) を使用した。図 2 (a) には TCDD (31.4 pM、1 nM) を 24 時間暴露させた時の、ルシフェラーゼ活性 (RLU/ μ g protein) を示した。12 個の DRE が挿入されたベクター (pGL7.3F) で最大のルシフェラーゼ活性が認められた。DRE を 4 個含むベクター (pGL7.1F) と比較し、約 5 倍の増強が認められた。また、pGL6.1 と比較すると、約 8 倍の増幅が認められた。全体的に DRE の挿入数が増えるとともに、ルシフェラーゼ活性が上昇する傾向が認められた。なお、DRE が逆方向に挿入された場合では、ルシフェラーゼ活性の大幅な増強は認められなかった。

図 2 (b) には各ベクターのルシフェラーゼ活性倍率 (各 TCDD 濃度における活性/TCDD を含まないブランクの活性) を示した。挿入された DRE 数による、活性倍率の大きな違いは認められなかった。この原因としては、ルシフェラーゼ活性が増大したベクターでは、TCDD を含まないブランクにおけるルシフェラーゼ活性も増大したためだと考えられる。pGL6.1 と比較すると、活性倍率はやや劣る程度であった。

2. TCDD 用量反応曲線

最もルシフェラーゼ活性倍率が高かった pGL7.5F について、TCDD 用量反応曲線を作製した。図 3 (a) には pGL7.5F の他、対照として pGL6.1 及び pGL7.1F の用量反応曲線を示した。全てのベクターで TCDD 濃度依存的にルシフェラーゼ活性の誘導が認められた。特に pGL7.5F ベクターはいずれの TCDD 濃度においても、他のベクターより顕著に高いルシフェラーゼ活性を示した。従って、低濃度におけるルシフェラーゼ活性の検出が容易になると考えられる。

図 3 (b) は各濃度におけるルシフェラーゼ活性倍率を示した。DRE を増やした場合は前述したとおりブランク値が上昇するため、pGL7.1F と pGL7.5F における活性倍率の大きな違いは認められなかった。汎用されている pGL6.1 ベクターと比較すると活性倍率は約半分であり、やや劣る程度であった。

以上の結果から、DRE を多く含むレポーターベクターは、ダイオキシン類に対する応答性が増強し、低濃度でのダイオキシン類検出が容易になる可能性があった。しかし、DRE を増やすにつれブランク値の上昇が生じるため、より高感度なアッセイを構築するためにはブランク値を低下させる必要があると考えられる。今後は、安定細胞株の作製を行うなどして、ブランク値が低いクローンを選択する必要があると考えられる。

D. 結論

- 1) 連結 DRE を正方向に多く導入することで、レポーターベクターの TCDD 応答性が高まった。
- 2) 連結 DRE を多く含むと、ブランク値におけるルシフェラーゼ活性の上昇が生じるため、活性倍率の大幅な上昇は認められなかった。
- 3) 今後は、検討したベクターを使用して安定細胞株を作製し、ブランク値の低いクローンを選択する必要があると考えられる。

E. 参考文献

- 1) 平成 13 年度厚生科学研究費補助金研究報告書「ダイオキシンの汚染実態把握及び摂取低減化に関する研究」(分担報告書 1-2 ダイオキシン類の迅速測定法の開発及び分析の精密化に関する研究)
- 2) Hoogenboom L, Goeyens L, Carbonnelle S, Van Loco J, Beernaert H, Baeyens W, Traag W, Bovee T, Jacobs G, Schoeters G.

The CALUX bioassay: Current status of its application to screening food and feed. Trends Analytical Chem., 25 (2006) 410-420.

3) 平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「ダイオキシンの汚染実態把握及び摂取低減化に関する研究」(分担報告書 3-1 ELISA による市販魚中のコプラナーPCBs 及び総 PCBs のスクリーニング法の開発)

4) 平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「ダイオキシン類による食品汚染実態の把握に関する研究」(分担報告書 3-1 PCB ELISA と Ah イムノアッセイによる市販魚中のダイオキシン類のスクリーニング法)

5) 平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「ダイオキシン類による食品汚染実態の把握に関する研究」(分担報告書 3-1 表面プラズモン共鳴センサーを用いた市販魚中のダイオキシン類スクリーニング法)

6) Denison MS, Zhao B, Baston DS, Clark GC, Murata H, Han D. Recombinant cell bioassay systems for the detection and relative quantitation of halogenated dioxins and related chemicals. Talanta, 63, (2004) 1123-1133.

7) 平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「化学物質リスク研究推進事業研究報告書」(外国への日本人研究者派遣事業)109-136

供与していただいたマイケル S.デニソン教授 (カリフォルニア大学)に感謝いたします。

F.研究業績

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

【謝辞】

ダイオキシン類応答性レポーターベクターを

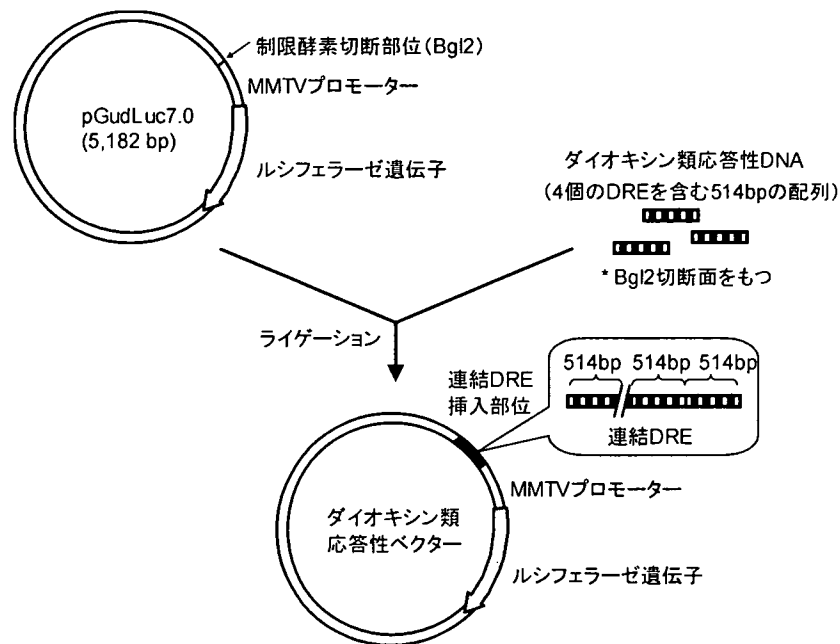


図1 連結DREを含むダイオキシン類応答性ベクターの作製法

表1 使用したダイオキシン類応答性ベクター

DREの数	ベクター名	挿入配列の向き ¹⁾
4	pGL7.1F (1-1)	⇨(正方向)
	pGL7.1R (1-2)	⇨(逆方向)
8	pGL7.2F (10-11)	⇨⇨
	pGL7.2R (1-21)	⇨⇨
12	pGL7.3F (14-8)	⇨⇨⇨
	pGL7.3R (15-12)	⇨⇨⇨
16	pGL7.4F (14-4)	⇨⇨⇨⇨
	pGL7.2R (16-6)	⇨⇨⇨⇨
20	pGL7.5F (3-18)	⇨⇨⇨⇨⇨

1) 1つの挿入配列に4つのDREを含んでいる。

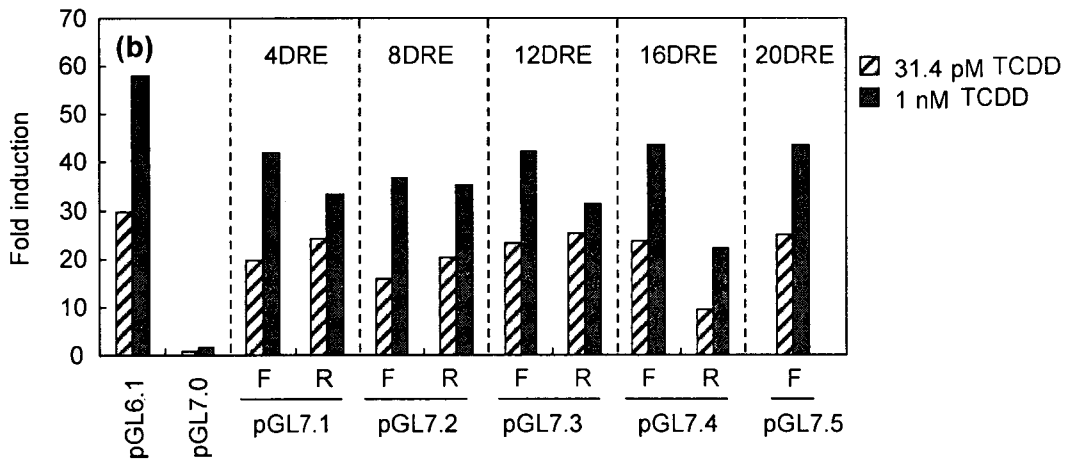
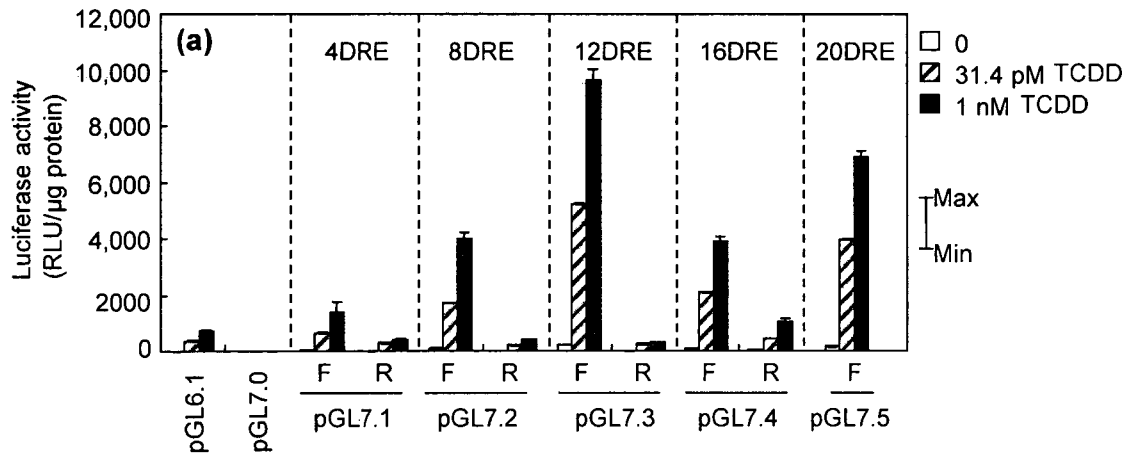


図2 連結DREを含むレポーターベクターのダイオキシン類応答性
 ベクター名のFは正方向に、Rは逆方向に連結したDREを含む
 (a) ルシフェラーゼ活性
 (b) ルシフェラーゼ活性倍率(各濃度における活性/ブランクにおける活性)